

Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski studij Prehrambena tehnologija

Bojana Brnica

6906/PT

KEMIJSKI SASTAV ESPRESSO KAVE „KIMBO“ I OTPADA
NASTALOG NJENIM KONZUMIRANJEM

ZAVRŠNI RAD

Predmet: Analitička kemija

Mentor: Doc. dr.sc. *Antonela Ninčević Grassino*

Zagreb, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

Završni rad

**Sveučilište u Zagrebu
Prehrambeno-biotehnološki fakultet
Preddiplomski sveučilišni studij Prehrambena tehnologija**

**Zavod za kemiju i biokemiju
Laboratorij za analitičku kemiju**

**Znanstveno područje: Biotehničke znanosti
Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija**

Kemijski sastav espresso kave „Kimbo“ i otpada nastalog njenim konzumiranjem

Bojana Brnica, 0067497034

Sažetak: Tijekom pripreme napitka espresso kave zaostaje čvrsti ostatak, koji se obično sakuplja i baca.

U ovom radu je određen kemijski sastav otpada nastalog konzumiranjem espresso kave „Kimbo“ u cilju valorizacije njegovih nutritivnih i fitokemijskih svojstava. Također, provedena je i kemijska analiza izvornog uzorka „Kimbo“ kave radi usporedbe dobivenih parametara. Sadržaj vlage, pepela, masti, celuloze i lignina određen je gravimetrijskom metodom, dok su ukupni fenoli, flavonoidi, šećeri i proteini određeni UV/Vis spektrofotometrijom.

Dobiveni rezultati su pokazali značajne razlike u kemijskom sastavu espresso kave i njenom otpadu, pri čemu je utvrđeno da otpad sadrži manje ukupnih fenola, flavonoida, šećera i proteina od izvornog uzorka, no više masti i lignina.

Bez obzira na niže dobivene vrijednosti nekih od analita, otpad kave sakupljen nakon njena konzumiranja može predstavljati iznimno pogodan biosupstrat za izolaciju različitih spojeva. No, daljnja istraživanja treba usmjeriti na ekstrakcije manje skupine ciljanih analita i njihove primjene u prehrambenoj industriji.

Ključne riječi: *espresso kava, kemijski sastav kave, UV/VIS spektrofotometrija, otpad kave*

Rad sadrži: 32 stranice, 8 slika, 9 tablica, 22 literaturna navoda

Jezik izvornika: hrvatski

Rad je u tiskanom i elektroničkom obliku pohranjen u knjižnici Prehrambeno-biotehnološkog fakulteta Sveučilišta u Zagrebu, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Doc. dr.sc. Antonela Ninčević Grassino

Datum obrane: 9. srpnja 2018.

BASIC DOCUMENTATION CARD

Bachelor thesis

**University of Zagreb
Faculty of Food technology and Biotechnology
University undergraduate study Food Technology**

**Department of Chemistry and Biochemistry
Laboratory for Analitical Chemistry**

**Scientific area: Biotechnical Sciences
Scientific field: Food technology**

Chemical composition of espresso coffee "Kimbo" and waste formed after its consumption

Bojana Brnica, 0067497034

Abstract: During preparation, espresso coffee drinks are leaving behind a solid residue, which is usually collected and thrown away. In this paper chemical composition of waste generated by the consumption of espresso coffee "Kimbo" was determined to valorize its nutritional and phytochemical properties. Also, chemical analysis of the original "Kimbo" coffee sample was performed to compare the obtained parameters. Moisture, ash, fat, cellulose and lignin contents was determined by the gravimetric method, while total phenols, flavonoids, sugars and proteins were determined by UV/Vis spectrophotometry.

The obtained results showed significant differences in the chemical composition of espresso coffee and its waste, where it was found that the waste contains less total phenols, flavonoids, sugars, and proteins than the original sample, but more fat and lignin. Regardless of the lower values of some of the analytes, coffee waste collected after its consumption can be an extremely suitable biosupstrat for the isolation of various compounds. However, further research should focus on the extraction of a smaller group of targeted analytes and their application in food industry.

Key words: *espresso coffee, chemical composition of coffee, UV/VIS spectrophotometry, coffee waste*

Thesis contains: 32 pages, 8 figures, 9 tables, 22 references

Original in: Croatian

Thesis is in printed and electronic form deposited in the library of the Faculty of Food Technology and Biotechnology, University of Zagreb, Kačićeva 23, 10 000 Zagreb

Mentor: Assistant Professor, PhD, Antonela Ninčević Grassino

Defence date: July 9th 2018

Sadržaj

1. UVOD.....	1
2. TEORIJSKI.....	2
2.1. Napitak od kave.....	2
2.2. Kemijski sastav kave	3
2.3. Gravimetrijske analitičke metode	3
2.4. Analitičke metode određivanja sadržaja vlage	4
2.5. Analitičke metode određivanja sadržaja pepela	5
2.6. UV/Vis spektrofotometrija	5
2.6.1. Kromogeni reagensi	6
3. MATERIJALI I METODE	7
3.1. Materijal.....	7
3.2. Kemikalije	7
3.3. Aparatura i pribor	8
3.4. Metode rada	9
3.4.1. Određivanje udjela vode u uzorcima	9
3.4.2. Određivanje udjela pepela u uzorcima	10
3.4.3. Određivanje udjela sulfatnog pepela u uzorcima	10
3.4.4. Određivanje udjela masti u uzorcima	10
3.4.5. Određivanje udjela celuloze u uzorcima	11
3.4.6. Određivanje udjela lignina u uzorcima	12
3.4.7. Određivanja ukupnih fenola, flavonoida, šećera i proteina u uzorcima	12
3.4.7.1. Priprema ekstrakata	13
3.4.7.2. Priprema otopina.....	13
3.4.7.3. Određivanje ukupnih fenola	14
3.4.7.4. Određivanje ukupnih flavonoida.....	15
3.4.7.5. Određivanje ukupnih šećera	16
3.4.7.6. Određivanje ukupnih proteina	17
3.4.7.7. Određivanje ukupne kiselosti i pH	18
4. REZULTATI I RASPRAVA	19
4.1. Sadržaj vlage u uzorcima kave i otpada.....	19
4.2. Sadržaj pepela i sulfatnog pepela u uzorcima kave i otpada	19
4.3. Sadržaj masti u uzorcima kave i otpada	20
4.4. Sadržaj celuloze i lignina u uzorcima kave i otpada	21
4.5. Ukupna kiselost i pH u uzorcima kave i otpada	21
4.6. Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima kave i otpada	21
4.7. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima kave i otpada	23
4.8. Sadržaj ukupnih šećera u uzorcima kave i otpada	25
4.9. Sadržaj ukupnih proteina u uzorcima kave i otpada.....	27
5. ZAKLJUČAK	30
6. POPIS LITERATURE.....	31

1. UVOD

Kava je već desetljećima jedna od najpopularnijih prehrambenih proizvoda i najčešće konzumiranih napitaka u svijetu. Od otvaranja prve kuće kave u Meki na kraju petnaestog stoljeća, potrošnja kave je iznimno porasla diljem svijeta. U 2010. godini proizvodnja kave dosegla je 8,1 milijuna tona širom svijeta (Farah, 2012). Razlozi kontinuiranog povećanja potrošnje kave povezani su s poboljšanom kvalitetom ovog napitka, nužno vezanom uz izbor sorti i načinom njihova uzgoja, otvaranja specijaliziranih trgovina, te širenjem informacija o zdravstvenim prednostima konzumacije kave.

Danas se kava smatra funkcionalnom hranom, prvenstveno zbog visokog sadržaja biološki aktivnih spojeva (Esquivel i Jiménez, 2012; Farah, 2012). Njihova ekstrakcija ovisi o načinu pripreme pržene mljevene kave, udjelu kave u odnosu na količinu vode, tvrdoću i temperaturu vode, te vremenu kontakta kave s vodom. Najčešće metode proizvodnje napitka od kave su perkolacija, prelijevanje s vrućom vodom, aparat za espresso, talijanski aparat za kavu te french press.

Pripravom napitaka kave zaostaje čvrsti ostatak, koji nema komercijalnu vrijednost i trenutno se prodaje kao kruti otpad ili se u nekim slučajevima koristi kao gnojivo. Uslijed činjenice da zaostali čvrsti ostatak predstavlja organski materijal s mnoštvom visoko vrijednih sastojaka, njihova izolacija iz svakodnevno nagomilane biomase svakako bi doprinijela smanjenju zagađenja okoliša, te iskorištavanja i ovog među brojnim vrstama biootpada.

S obzirom da je u Laboratoriju za analitičku kemiju pri pripremi 1 šalice espresso kave dnevno utrošeno od oko 8 g izvorne „Kimbo“ kave, nakupljena količina biootpada tijekom 1 godine iznosila je približno 3 kg. Stoga je cilj ovog rada bio odrediti kemijski sastav otpada espresso kave „Kimbo“ nastalog nakon pripreme napitka tradicionalnim talijanskim aparatom za kavu (*engl.* authentic italian espresso coffee). Radi usporedbe dobivenih količina i valorizacije potencijalnih vrijednosti otpada, određen je i kemijski sastav polazne espresso kave „Kimbo“.

Analize su se sastojale od određivanja:

- sadržaja vlage, pepela, masti, celuloze i lignina gravimetrijskom analitičkom metodom,
- sadržaja ukupnih fenola, flavonoida, šećera i proteina UV/Vis spektrofotometrijom,
- ukupne kiselosti, volumetrijskom, kiselinsko - baznom titracijom i
- pH - vrijednosti pripremljenih ekstrakta.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. Napitak od kave

Kava je tropska biljka koja raste na 600 - 1800 m nadmorske visine. Izvorno se iz Etiopije, proširila u Indiju, a potom u Indoneziju, Brazil, Kolumbiju i Srednju Ameriku. Stablo ili grm kave pripada obitelji Rubiaceae (Mussatto i *sur.*, 2011). Zrna kave proizvode se od biljke *Coffea* L., kojoj pripadaju više od 70 vrsta. Međutim, samo dvije od tih vrsta koriste se u komercijalne svrhe širom svijeta. To su *Coffea arabica* (Arabika), koja se smatra najplemenitijom od svih biljaka kave i ona čini 75 % svjetske proizvodnje te *Coffea canephora* (Robusta), koja se smatra kiselom vrstom i čini 25 % svjetske proizvodnje (Mussatto i *sur.*, 2011).

Ono što je obično poznato pod nazivom kava jest napitak koji je pripremljen iz prženih zrna kave. Biljka *Coffea* daje plodove slične trešnji (Slika 1) koja sadrže dva sjemena koja se tehnološkim procesom odvajaju od voćne pulpe. Zelena zrna kava se potom pakiraju u vreće i prevoze u zemlje gdje se dalje prerađuju do konačnog proizvoda koji se koristi za izradu napitka (Buffo i Cardelli-Freire, 2004).



Slika 1. Plod kave (preuzeto s interneta).

2.2. Kemijski sastav kave

Zelena kava prvenstveno se sastoji od vode, ugljikohidrata, vlakana, proteina, lipida, minerala, organskih kiselina, klorogenih kiselina, trigonelina i kofeina (Farah, 2012). Od navedenih spojeva klorogenske kiseline, kofein, trigonelin, topljiva vlakna i diterpeni iz lipidne frakcije spadaju u bioaktivne spojeve te doprinose aromi pića nakon prženja zrna (Farah, 2012).

Također u zrnu kave su identificirani i manji fenolni spojevi, kao što su antocijanini i lignani, zabilježeni kao ostaci iz plodova, te tragovi teofilina i teobromina kao ostaci iz sjemena (Farah, 2012). Od minerala nađeni su kalij, magnezij, kalcij, natrij, željezo, mangan, rubidij, cink, bakar, stroncij, krom, vanadij, barij, nikal, kobalt, olovo, molibden, titan i kadmij (Mussato i *sur.*, 2011).

Među šećerima je prisutna saharoza, glukoza, fruktoza, arabinoza, galaktoza i manoza (Mussato i *sur.*, 2011), a od aminokiselina alanin, arginin, asparagin, cistein, glutaminska kiselina, glicin, histidin, izoleucin, leucin, lizin, metionin, fenilalanin, prolin, serin, treonin, tirozin i valin (Mussato i *sur.*, 2011). Osim navedenih spojeva zrna kave sadrže i vitamine B kompleksa, u omjerima koji mogu varirati od 7 do 12 % (Mussato i *sur.*, 2011).

Među spojevima prisutnim u kemijskom sastavu kave, samo kofein je termostabilan (do temperature 235°C), te se ne može potpuno uništiti prženjem. Za razliku od kofeina proces prženja utječe na potpunu degradaciju proteina, šećera, klorogenskih kiselina, trigonelina i masti ili njihova prevođenje u reaktivne spojeve (Mussato i *sur.*, 2011).

2.3. Gravimetrijske analitičke metode

Gravimetrijske metode analize temelje se na mjerenju mase. Postoje dvije vrste gravimetrijskih analiza, metoda ishlapljivanja i taložna metoda (Skoog, 1999).

Postupak metode ishlapljivanja se bazira na tome da analit ili produkt razgradnje ishlape na prikladnoj temperaturi, a hlapljivi produkt se skuplja i važe ili se masa produkta odredi posredno iz gubitka mase uzorka (Skoog, 1999). Ova metoda se može koristiti kod određivanja sadržaja vlage i pepela u namirnicama.

Taložna metoda se izvodi na način da se analit prevede u slabo topljivi talog koji se potom odfiltrira, ispere i termički obradi, a produkt dobiven tom obradom se važe.

Kod taložne metode se stvara talog pomoću reagensa koji mora s analitom reagirati specifično ili selektivno. Idealni reagens u reakciji s analitom daje produkt koji se lako filtrira i ispere, ima dovoljno malu topljivost, ne ulazi u kemijsku reakciju sa sastojcima u atmosferi i nakon sušenja ima poznat sastav. Vrste reagensa koje se koriste su: anorganski taložni reagensi koji stvaraju slabo topljive soli, organski taložni reagensi koji stvaraju slabo topljive neionske produkte i reducirajući reagensi koji prevode analit u njegov elementarni oblik koji se važe (Skoog, 1999). Ova metoda se može koristiti kod određivanja sadržaja celuloze i lignina u namirnicama.

2.4. Analitičke metode određivanja vlage

Udio vlage jedan je od najvažnijih mjerenih svojstava sirovina. O njemu ovisi rok trajanja, tekstura, kvaliteta, svojstva sirovina te uvjeti proizvodnje i skladištenja sirovine. Uklanjanjem vlage ostatak koji zaostaje naziva se ukupna suha tvar (Bradley, 2010).

Metode određivanja sadržaja vlage mogu se podijeliti u 5 kategorija: evaporacijske metode, destilacijske metode, metode s kemijskim reakcijama, fizikalne metode te spektrometrijske metode (Bradley, 2010).

Evaporacijske metode se temelje na mjerenju mase vode u poznatoj masi uzorka. Sadržaj vlage određuje se mjerenjem mase namirnice prije i poslije uklanjanja vode evaporacijom. Za isparavanje vode koristi se termička energija i ona se može osigurati izravno (npr. prenošenjem topline iz pećnice u hranu) ili posredno (npr. konverzijom elektromagnetskog zračenja u toplinu).

Metode destilacije temelje se na izravnom mjerenju količine vode uklonjene iz uzorka hrane isparavanjem. Reakcije između vode i određenih kemijskih reagenasa mogu se koristiti kao osnova za određivanje koncentracije vlage u namirnicama. U toj metodi u namirnice koje specifično reagiraju s vodom dodaje se kemijski reagens da bi se proizvela mjerljiva promjena kao npr. promjena u masi, volumenu, tlaku, pH, boji te konduktivnosti (McClement, 2003).

Razvijen je i niz fizikalnih metoda određivanja sadržaja vlage koje se temelje na činjenici da voda ima znatno različite fizičke karakteristike od same namirnice, npr. gustoća, električna vodljivost ili indeksa loma.

Spektrometrijske metode koriste interakciju elektromagnetskog zračenja s materijalima radi dobivanja informacija o njihovom sastavu, npr. X-zrake, UV-zrake, NMR, mikrovalovi i infracrveno zračenje.

2.5. Analitičke metode određivanja sadržaja pepela

Pepeo je anorganski ostatak, zaostao nakon spaljivanja organskih tvari. Količina i sastav pepela u prehrambenom proizvodu ovise o prirodi namirnice kao i o metodi njena spaljivanja (Pomeranz i Meloan 1994).

Udio pepela je mjera ukupne količine minerala prisutnih u hrani, dok je mineralni sastav i sadržaj mjera specifičnih anorganskih komponenti u hrani.

Analitičke metode koje se koriste za određivanje ukupnog mineralnog sadržaja temelje se na činjenici da minerali nisu uništeni grijanjem i da imaju nisku temperaturu isparavanja u usporedbi s ostalim sastojcima hrane.

Tri glavna tipa analitičkih postupka koji se koriste za određivanje ukupnog pepela u hrani su: spaljivanje, vlaženje i nisko temperaturno sušenje u plazmi (McClement, 2003).

Metoda odabrana za određenu analizu ovisi o vrsti namirnice i dostupnoj opremi.

2.6. UV/Vis spektrofotometrija

Apsorpcija elektromagnetskog zračenja valnih duljina između 200 i 800 nm može se koristiti za kvalitativnu i kvantitativnu analizu molekula koje imaju π elektrone ili atome koji posjeduju nesparene elektronske parove.

Apsorpcija ultraljubičastog (UV) ili vidljivog (Vis) zračenja u molekulama javlja se kao rezultat interakcije električnog polja s elektronima molekula (Miyawa i Schulman, 2001).

Ultraljubičasto područje odnosi se na valne duljine od 10 do 380 nm, dok se područje vidljivog dijela spektra odnosi na valne duljine od 380 do 780 nm. Odnos između koncentracije analita i intenziteta apsorbirane svjetlosti temelj je kvantitativne primjene spektrofotometrije, a definiran je Lambert-Beerovim zakonom koji glasi (1):

$$A = \varepsilon \cdot b \cdot c \quad (1)$$

gdje je A apsorbancija, ε molarni apsorpcijski koeficijent, b debljina sloja otopine i c množinska koncentracija.

2.6.1. Kromogeni reagensi

Neke vrste analita ne apsorbiraju elektromagnetsko zračenje same od sebe, već je potrebno upotrijebiti kromogene reagense koje ih prevode u oblik moguć za spektrofotometrijsko određivanje. Tako se Folin-Ciocalteu reagens koristi kod određivanja ukupnih fenola, aluminijev klorid kod ukupnih flavonoida, fenol kod ukupnih šećera i bakrov sulfat kod ukupnih proteina.

Detaljan uvid upotrebe navedenih reagenasa i odgovarajućih principa spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola, flavonoida, šećera i proteina je opisan u niže navedenom poglavlju (3.4.7.).

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijal

Espresso kava „Kimbo“ kupljena na talijanskom tržištu (Salerno, Italija) i otpad nastao njenim konzumiranjem prikazani su na Slici 2.



Slika 2. Espresso kava „Kimbo“ (a) i otpad nastao nakon njena konzumiranja (b)¹.

3.2. Kemikalije

- Aluminijev klorid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Bakrov sulfat (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Bovin serum albumin, BSA (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Etanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)
- Fenol (Acros organics, Geel, Belgija)
- Fenolftalein (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Folin-Ciocalteu reagens (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Galna kiselina (Acros Organics, New Jersey, USA)
- Glukoza monohidrat (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA)
- Kalijev jodid (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Kalij natrij tartarat (Alkaloid, Skopje, Makedonija)
- Metanol (Gram-mol, Zagreb, Hrvatska)

¹Sve slike izvorno nastale u Laboratoriju za analitičku kemiju

- Natrijev karbonat, bezvodni (Kemika, Zagreb, Hrvatska)
- Natrijev nitrit (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Natrijev hidroksid (T.T.T., Sveta Nedjelja, Hrvatska)
- Petroleter (Carlo Erba Reagents S.A.S., Francuska)
- Rutin (Alfa Aesar, Karlsruhe, Njemačka)
- Sumporna kiselina (Kefo, Zagreb, Hrvatska)

3.3. Aparatura i pribor

- Analitička vaga (JOBST, Samobor, Hrvatska)
- Automatska pipeta volumena 40 - 200 μ L (KemoLab, Zagreb, Hrvatska)
- Magnetska miješalica (IKA, RH basic 2, Boutersem, Belgija)
- Mufolna peć (Model Heraew)
- pH metar (Model Hanna 98150, Zagreb, Hrvatska)
- Vodena kupelj za Soxlet ekstrakciju (Inka, Zagreb, Hrvatska)
- Sušionik (Instrumentaria, Zagreb, Hrvatska)
- UV/Vis Spektrofotometar (Perkin-Elmer, Lambda 25, Massachusetts, USA)
- Vorteks (Metron, Zagreb, Hrvatska)
- Aluminijske posudice
- Boce za čuvanje otopina od 500 mL
- Celulozne čahure (tuljci)
- Eksikator sa silika gelom
- Erlenmeyerove tikvice 100 mL
- Erlenmeyerove tikvice s brušenim grlom 250 mL
- Falcon kivete za čuvanje uzoraka, 50 mL
- Filter papir
- Gooch lončići
- Graduirane pipete od 1, 2 i 5 mL
- Menzure od 10, 100 i 500 mL
- Odmjerne tikvice od 10, 25, 50, 100 i 500 mL
- Pinceta
- Plamenik
- Porculanske zdjelice
- Povratno hladilo

- Propipeta
- Satno staklo
- Staklene čaše od 50,100 i 500 mL
- Stakleni lijevci
- Stakleni štapići
- Tikvice s okruglim dnom od 250 mL

3.4. Metode rada

U ovom radu su korištene sljedeće analitičke tehnike:

- gravimetrija: određivanje udjela vlage, pepela, masti, celuloze i lignina,
- spektrofotometrija u UV i Vis području elektromagnetskog zračenja: ukupni fenoli, ukupni flavonoidi, ukupni šećeri i proteini
- volumetrijsko kiselinsko-bazna titracija: ukupna kiselost
- ekstrakcija: refluksiranje i Soxlet

3.4.1. Određivanje udjela vode u uzorcima

Sušenje je provedeno na uzorcima espresso kave „Kimbo“ i otpadu nastalom njenim konzumiranjem.

2 g uzoraka kave, odvaže se u prethodno osušene, ohlađene i izvagane aluminijske posudice. Posudice s uzorkom se suše na 105 °C do konstantne mase, a zatim hlade u eksikatoru 1 h, te važu.

Maseni udio vode u kavi i njenom otpadu izračuna se na temelju razlike u masi prije i nakon sušenja uzoraka prema formuli 2:

$$w(\text{vode}) = \frac{m_2 - m_3}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad (2)$$

gdje je m_1 - masa prazne aluminijske posudice (g), m_2 - masa aluminijske posudice s uzorkom prije sušenja (g) i m_3 - masa aluminijske posudice s uzorkom nakon sušenja (g).

3.4.2. Određivanje udjela pepela u uzorcima

Odvaže se po 1 g uzorka kave i njenog otpada u prethodno žarene, ohlađene (eksikator) i izvagane porculanske zdjelice. Nakon što se uzorci karboniziraju na plameniku, stave se u mufolnu peć na 600 °C, 4 sata ili do postizanja pepela konstantne mase. Nakon žarenja, porculanske zdjelice s pepelnim ostatkom se hlade u eksikatoru 1 h i važu, a zatim se udio pepela izračuna prema formulu 3:

$$w(\text{pepeo}) = \frac{m_3 - m_1}{m_2 - m_1} \cdot 100 \quad (3)$$

gdje je: m_1 - masa prazne porculanske zdjelice (g), m_2 - masa porculanske zdjelice i uzorka prije spaljivanja (g) i m_3 - masa porculanske zdjelice i pepela (g).

3.4.3. Određivanje udjela sulfatnog pepela u uzorcima

Nakon određivanja udjela pepela u uzorcima kave i njenog otpada (poglavlje 3.4.2.), pepelnim ostacima se doda 1 mL koncentrirane sumporne kiseline i zagrijava na plameniku do nestanka bijelog dima. Nakon hlađenja doda se još nekoliko kapi sumporne kiseline i potom se porculanske zdjelice stave u mufolnu peć na 600 °C, 2 sata. Nakon spaljivanja, porculanske zdjelice s pepelnim ostatkom se hlade 1 h u eksikatoru i važu, a potom se udio sulfatnog pepela izračuna iz formule 4:

$$w(\text{sulfatni pepeo}) = \frac{m(\text{sulfatni pepeo})}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 \quad (4)$$

gdje je: $m(\text{sulfatni pepeo})$ - razlika u masi porculanske zdjelice s pepelom prije i nakon dodatka sumporne kiseline (g), m - masa uzorka uzetog za analizu (g).

3.4.4. Određivanje udjela masti u uzorcima Soxlet ekstrakcijom

Točno 2 g prethodno osušenih uzorka (poglavlje 3.4.1.) odvaže se u celulozne čahure, koje se potom stave u ekstraktore Soxhletove aparature. Tikvice s okruglim dnom,

prethodno sušene na 105 °C, ohlađene 1 h u eksikatoru i izvagane spoje se na ekstraktore i urone u vodenu kupelj.

Ekstrakcija uzoraka se provodi petroleterom 8 h na temperaturi ključanja otapala. Nakon završene ekstrakcije, tikvice s ekstraktom se suše na 105 °C, 2 sata, hlade, te važu. Ekstrakcija se ponavlja nekoliko puta (postizanje konstantne mase tikvice s ekstrahiranom masti), a potom se sadržaj masti izračuna prema formuli 5:

$$w \text{ (masti)} = \frac{m_2 - m_1}{m \text{ (uzorak)}} \cdot 100 \quad (5)$$

gdje je m_1 - masa prazne tikvice (g), m_2 - masa tikvice i ekstrahirane masti (g) i m - masa uzorka uzetog za analizu (g).

3.4.5. Određivanje udjela celuloze u uzorcima

Odvaže se 2 g odmašćenog uzorka (poglavlje 3.4.4.) u Erlenmeyerovu tikvicu s brušenim grlom, doda se 200 mL kipuće 0,255 mol L⁻¹ sumporne kiseline. Otopina se refluksira 1 sat te se vruća filtrira preko Gooch lončića.

Zaostali talog ispire se nekoliko puta s 40 do 50 mL kipuće destilirane vode, a zatim se isprani ostatak vrati u Erlenmeyerovu tikvicu, prelije s 200 mL kipućeg 0,313 mol L⁻¹ natrijevog hidroksida te ponovo refluksira, dodatnih sat vremena.

Nakon završenog refluksiranja otopina se profiltrira preko Gooch lončića, a potom se zaostali talog ispire nekoliko puta s 30 mL etanola i oko 50 mL kipuće destilirane vode. Nakon sušenja (105 °C preko noći), spaljivanja (mufolna peć, 4 h) i hlađenja (eksikator, 1 h), Gooch lončići s talogom se važu, a maseni udio celuloze dobije se iz formule 6:

$$w \text{ (celuloza)} = \frac{m_2 - m_1}{m \text{ (uzorak)}} \cdot 100 \quad (6)$$

gdje je m_1 - masa Gooch lončića, m_2 - masa Gooch lončića s odmašćenim uzorkom nakon spaljivanja i m - masa odmašćenog uzorka uzetog za analizu.

3.4.6. Određivanje udjela lignina u uzorcima

Odvagan je po 1 g uzorka u čaše od 800 mL, dodano je 15 mL 72 % (v/v) sumporne kiseline i ostavljeno da stoji 2,5 sata na sobnoj temperaturi uz povremeno miješanje staklenim štapićem. Potom je dodano 560 mL destilirane vode i kuhano na vodenoj kupelji 4 sata pokriveno satnim stakalcem. Vrući sadržaj profiltriran je preko prethodno osušenog i odvagano filter papira, a zatim je zaostali talog ispran s destiliranom vodom do neutralne reakcije.

Vlažan filter papir s talogom osušen je na temperaturi od 105 °C do konstantne mase, ohlađen (eksikator, 1 h) i odvagan. Maseni udio lignina izračunat je prema formuli 7:

$$w(\text{lignin}) = \frac{m_2 - m_1}{m(\text{uzorak})} \cdot 100 \quad (7)$$

gdje je m_1 - masa praznog filter papira (g), m_2 - masa filter papira s osušenim ostatkom (g) m - masa uzorka uzetog za analizu (g).

3.4.7. Određivanje ukupnih fenola, flavonoida, šećera i proteina u uzorcima

Maseni udio ukupnih fenola u uzorcima espresso kave i otpada dobivenog njenim konzumiranjem određen je Folin-Ciocalteu metodom koja se zasniva na kolorimetrijskoj reakciji fenolnih spojeva sa smjesom fosforvolframove i fosfomolibdenske kiseline tj. s Folin-Ciocalteu (FC) reagensom. Uslijed reakcije FC reagensa s fenoksidnim ionom iz uzorka dolazi do stvaranja plavo obojene otopine volframovog i molibdenovog oksida, a intenzitet nastalog obojenja mjeri se na valnoj duljini od 760 nm (Agbor i *sur.*, 2014).

Maseni udio ukupnih flavonoida u uzorcima određen je spektrofotometrijski, metodom koja se zasniva na formiranju stabilnog aluminijsko-flavonoid kompleksa između aluminijske i C4 keto skupine i C3 ili C5 hidroksilne skupine flavona i flavonola. Nakon dodatka aluminijskog klorida i natrijeva hidroksida dolazi do stvaranja crveno obojenog kompleksa, a intenzitet nastalog obojenja mjeri se na valnoj duljini od 510 nm (Pekal i Pyrzyńska, 2014).

Sadržaj ukupnih šećera u uzorcima espresso kave i njenog otpada određen je primjenom brzog i reproducibilnog postupka za određivanje jednostavnih šećera i njegovih derivata koji koristi fenol kao specifični organski reagens uz vruću sumpornu kiselinu. Redukcija šećera uz stvaranje žuto obojene otopine (Ashwell, 1966) mjeri se na valnoj duljini od 490 nm.

Sadržaj ukupnih proteina u uzorcima određen je primjenom Biuret metode, koja se temelji se na kompleksometrijskoj reakciji iona bakra s peptidnim vezama ($-\text{CO}-\text{NH}$) proteina u lužnatoj sredini, stvarajući ljubičasto obojenje (Kruezigier Keppy i Allen, 2009).

3.4.7.1. Priprema ekstrakata

Ekstrakcija refluksiranjem provedena je na uzorcima espresso kave „Kimbo“ i otpadu nastalom konzumiranjem espresso kave radi dobivanja ekstrakata u kojima su određeni ukupni fenoli, flavonoidi, šećeri i proteini, te ukupna kiselost i pH.

Odvagano je 3 g uzorka i ekstrahirano s 50 mL destilirane vode 1 sat pri 100 °C za određivanje ukupnih fenola, flavonoida, šećera, ukupne kiselosti i pH, te 60 °C za određivanje proteina.

Nakon završene ekstrakcije, uzorci su filtrirani preko grubog filter papira, a potom su dobivene suspenzije uzoraka još jednom profiltrirane preko finog filter papira (plava vrpca) u falcon kivete. Priređeni ekstrakti čuvani su u hladnjaku na +4 °C do početka analize.

3.4.7.2. Priprema otopina

Otopine korištene u postupku određivanje ukupnih fenola su:

- Folin-Ciocalteu (FC) reagens ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$)

Otpipetira se 2,5 mL FC reagensa ($c = 2 \text{ mol L}^{-1}$) u 25 mL destilirane vode.

- Otopina natrijevog karbonata ($w = 20 \text{ \%, } w/v$)

Otopi se 200 g natrijevog karbonata u 800 mL vruće, ključale destilirane vode i nakon hlađenja dodaje se nekoliko kristalića natrijevog karbonata. Nakon 24 sata otopina se profiltrira.

- Galna kiselina ($\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$)

Izvaže se 0,25 g galne kiseline te se pomoću 10 mL etanola kvantitativno prenese u odmjernu tikvicu od 50 mL, a potom se tikvica nadopuni deioniziranom vodom do oznake.

Otopine korištene u postupku određivanje ukupnih flavonoida su:

- Otopina rutina ($\gamma = 1 \text{ g L}^{-1}$)

0,1000 g rutina otopi se u 10 mL metanola u odmjernoj tikvici od 100 mL, te se odmjerena tikvica nadopuni s metanolom.

- Natrijev nitrit ($w = 5 \%$, w/v)
Odvaže se 5 g NaNO_2 i otopi u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.
- Aluminijski klorid ($w = 10 \%$, w/v)
Odvaže se 10 g AlCl_3 i otopi u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.
- Natrijev hidroksid ($c = 1 \text{ mol L}^{-1}$)
Odvaže se 2 g NaOH i otopi u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 100 mL.

Otopine korištene u postupku određivanja ukupnih šećera su

- Otopina glukoze ($\gamma = 2000 \text{ mg L}^{-1}$)
Odvagano je 100 mg glukoze i otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 50 mL.
- Otopina fenola ($w = 5 \%$, w/v)
Otopljeno je 2,5 g fenola u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 50 mL.

Otopine korištene u postupku određivanja ukupnih proteina su:

- Biuret reagens
Odvagano je 1,6 g NaOH , 1,8 g KNa tartarata, 0,6 g CuSO_4 i 1,8 g KI te otopljeno u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 200 mL.
- Otopina BSA standarda ($\gamma = 5 \text{ mg mL}^{-1}$)
Otopljeno je 0,253 g BSA u deioniziranoj vodi, u odmjerne tikvici od 25 mL.

3.4.7.3. Određivanje ukupnih fenola

U cilju izrade baždarnog dijagrama za određivanje nepoznatih masenih koncentracija ukupnih fenola u uzorcima kave i njenog otpada, alikvoti od 0,1; 0,3; 0,5; 1,0; 1,3 i 1,8 mL ishodne standardne otopine galne kiseline ($\gamma = 5 \text{ g L}^{-1}$) otpipetirani su u odmjerne tikvice od 50 mL za pripremu pojedinačnih standardnih otopina masenih koncentracija 10, 30, 50, 100, 130 i 180 mg L^{-1} .

Iz ovako priređenih pojedinačnih standardnih otopina otpipetira se po 1 mL u odmjerne tikvice od 25 mL, te se doda 10 mL destilirane vode, 1,25 mL FC reagensa ($c = 0,2 \text{ mol L}^{-1}$) i nakon 5 minuta 3,75 mL 20 % otopine Na_2CO_3 . Tikvice se nadopune destiliranom vodom do oznake, te čuvaju na sobnoj temperaturi, na tamnom mjestu 2 sata, nakon čega im se izmjeri apsorbancija na valnoj duljini od 760 nm. Na isti način pripremi se i slijepa proba, ali umjesto 1 mL standarda uzima se 1 mL destilirane vode.

Uzorci espresso kave i njenog otpada s nepoznatim masenim koncentracijama ukupnih fenola pripremljeni su na isti način kao i standardne otopine, ali umjesto 1 mL

pojedinačne standardne otopine uzeto je 0,4 mL razrijeđenog ekstrakta „Kimbo“ kave, odnosno 0,2 mL refluksiranog uzorka njenog otpada.

Razrijeđeni ekstrakt espresso kave „Kimbo“ priređen je tako da je 1 mL ekstrakata espresso kave dobivenog postupkom refluksiranja (poglavlje 3.4.7.1.) otpipetiran u odmjernu tikvicu od 25 mL, koja je potom nadopunjena s destiliranom vodom.

Iz izmjerenih apsorbancija pripremljenih pojedinačnih standardnih otopina i njihovih masenih koncentracija izradi se baždarni dijagram, a zatim se iz dobivene jednadžbe pravca izračuna masena koncentracija, a zatim i maseni udio ukupnih fenola u uzorcima kave i njenog otpada.

3.4.7.4. Određivanje ukupnih flavonoida

U cilju izrade baždarnog dijagrama za određivanje nepoznatih masenih koncentracija ukupnih flavonoida u uzorcima kave i njenog otpada bilo je potrebno iz ishodne otopine rutina, masene koncentracije 1 g L^{-1} otpipetirati 0,5; 1,5; 2,5; 5,0; 6,5 i 9,0 mL u odmjerne tikvice od 50 mL za pripremu pojedinačnih standardnih otopina koncentracija 10, 30, 50, 100, 130 i 180 mg L^{-1} .

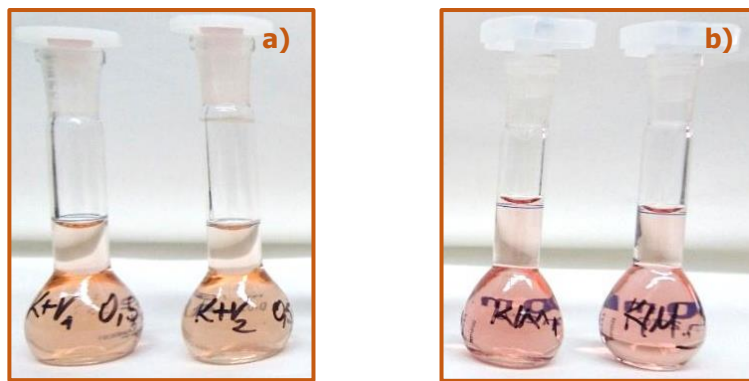
Iz priređenih pojedinačnih standardnih otopina otpipetira se 1 mL u odmjerne tikvice od 10 mL te se doda 2 mL destilirane vode, 0,3 mL 5 %-tne otopine NaNO_2 , 0,5 mL 10 %-tne otopine AlCl_3 (nakon 5 minuta) i 2 mL NaOH , $c = 1 \text{ mol L}^{-1}$ (nakon 6 minuta), a potom se tikvice nadopune destiliranom vodom do oznake.

Na isti način priprema se i slijepa proba no umjesto 1 mL standarda dodaje se isti volumen destilirane vode.

Uzorci espresso kave i njenog otpada s nepoznatim masenim koncentracijama ukupnih flavonoida pripremljeni su na isti način kao i standardne otopine no umjesto 1 mL pojedinačne standardne otopine uzeto je 0,4 mL razrijeđenog ekstrakta espresso kave i 0,2 mL refluksiranog ekstrakta otpada espresso kave (Slika 3).

Priprema razrijeđenog ekstrakata kave opisana je u poglavlju 3.4.7.3.

Tako priređenim otopinama izmjeri se apsorbancija pri valnoj duljini od 510 nm, a zatim se iz izmjerenih apsorbancija i masenih koncentracija pojedinačnih otopina rutina izradi baždarni dijagram. Iz dobivene jednadžbe pravca izračuna se koncentracija, odnosno maseni udio ukupnih flavonoida u uzorcima.



Slika 3. Otopine espresso kave (a) i otpada dobivenog njenim konzumiranjem (b) pripremljene za određivanje ukupnih flavonoida UV/Vis spektrofotometrijom.

3.4.7.5. Određivanje ukupnih šećera

Za izradu baždarnog dijagrama potrebno je iz ishodne standardne otopine glukoze ($\gamma = 2000 \text{ mg L}^{-1}$) otpipetirati 0,125; 0,25; 0,5; 1,0; 1,5 i 2,0 mL u odmjerne tikvice od 50 mL da bi se pripremile pojedinačne standardne otopine masenih koncentracija 5, 10, 20, 40, 60, 80 mg L^{-1} .

Iz priređenih pojedinačnih standardnih otopina otpipetira se 1 mL u odmjerne tikvice od 25 mL te se doda 1 mL 5 %-tne otopine fenola i 5 mL koncentrirane H_2SO_4 . Nakon miješanja na vorteksu, smjesa zagrijana 5 minuta na vodenoj kupelji uz ključanje se hladi u posudi s ledom. Nakon stajanja na tamnom mjestu 30 minuta na sobnoj temperaturi priređenim otopinama izmjeri se apsorbancija pri 492 nm.

Na isti način priprema se i slijepa proba, ali umjesto 1 mL standarda uzima se 1 mL destilirane vode.

Uzorci espresso kave i njenog otpada s nepoznatim masenim koncentracijama ukupnih šećera pripremljeni su na isti način kao i standardne otopine no umjesto 1 mL pojedinačne standardne otopine uzet je 1 mL razrijeđenih ekstrakata espresso kave, odnosno njenog otpada (Slika 4).

Razrijeđeni ekstrakti espresso kave (0,5:50, v/v) i otpada nastalog njenim konzumiranjem (1:50, v/v) priređeni su tako da je 0,5 mL ekstrakata espresso kave, odnosno 1 mL njenog otpada, dobivenih postupkom refluksiranja (poglavlje 3.4.7.1.) otpipetiran u odmjerne tikvice od 50 mL, koje su potom nadopunjene s destiliranom vodom.

Iz izmjerenih apsorbancija pripremljenih standardnih otopina i masenih koncentracija otopine glukoze izradi se baždarni dijagram, a iz dobivene jednadžbe pravca izračuna se koncentracija, odnosno maseni udio ukupnih šećera u uzorcima.



Slika 4. Otopine espresso kave (a) i otpada dobivenog njenim konzumiranjem (b) pripremljene za određivanje ukupnih šećera UV/Vis spektrofotometrijom.

3.4.7.6. Određivanje ukupnih proteina

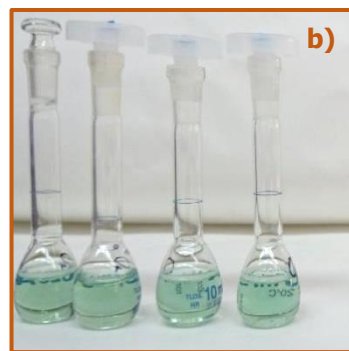
Za izradu baždarnog dijagrama pripremljene su pojedinačne standardne otopine masenih koncentracija 0,1; 0,2; 0,4; 0,8; 1,2 i 1,6 mg mL⁻¹ tako da su alikvoti od 0,2; 0,4; 0,8; 1,6; 2,4 i 3,2 mL ishodne otopine BSA ($\gamma = 5$ mg mL⁻¹) otpipetirani u odmjerne tikvice od 10 mL, koje su potom nadopunjene s destiliranom vodom do oznake.

Iz ovako priređenih pojedinačnih standardnih otopina otpipetira se po 3 mL u odmjerne tikvice od 10 mL te se doda 3 mL biuret reagensa (Slika 5). Nakon što se otopine homogeniziraju na vorteksu i inkubiraju na sobnoj temperaturi 30 minuta, izmjeri im se i apsorbanacija pri valnoj duljini od 540 nm.

Na isti način priprema se i slijepa proba, ali umjesto 1 mL standarda uzima se 1 mL destilirane vode.

Za određivanje ukupnih proteina u uzorcima otpipetiran je 1 mL razrijeđenog ekstrakata espresso kave, odnosno 1 mL refluksiranog ekstrakta otpada, te je dodano 2 mL deionizirane vode i 3 mL biuret reagensa.

Razrijeđeni ekstrakt espresso kave priređen je tako da je 1 mL ekstrakata espresso kave dobivenog postupkom refluksiranja (poglavlje 3.4.7.1.) otpipetiran u odmjernu tikvicu od 25 mL, koje su potom nadopunjene s destiliranom vodom.



Slika 5. Otopine espresso kave (a) i otpada dobivenog njenim konzumiranjem (b) pripremljene za određivanje ukupnih proteina UV/Vis spektrofotometrijom.

3.4.7.7. Određivanje ukupne kiselosti i pH

Za određivanje ukupne kiselosti refluksirani ekstrakti kave i njenog otpada opisani u poglavlju 3.4.7.1. su razrijeđeni u prikladnim omjerima.

Točno 1 mL refluksiranog ekstrakta kave je otpipetiran u odmjernu tikvicu od 25 mL koja je nadopunjena do oznake destiliranom vodom. Potom je 10 mL alikvota tako priređene razrijeđene otopine otpipetirano u drugu odmjernu tikvicu od 50 mL te nadopunjeno s destiliranom vodom do oznake.

Iz refluksiranog ekstrakta otpada kave otpipetirano je 10 mL u odmjernu tikvicu od 50 mL koja je nadopunjena do oznake destiliranom vodom.

Točno 10 mL alikvota kave, odnosno njenog otpada otpipetiranih iz konačnih razrijeđenih otopina (50 mL) je titirao sa otopinom NaOH ($c = 0,1 \text{ mol L}^{-1}$) uz fenolftalein kao indikator.

Nakon završene titracije rezultati ukupne kiselosti su izraženi kao g limunske kiseline na 100 g uzorka, uzimajući u obzir volumen utrošenog NaOH (0,1 mL za kavu i 0,2 mL za njen otpad), te razrijeđenja refluksiranih uzoraka.

pH vrijednosti otopina kave i njenog otpada određene su pomoću pH metra u refluksiranim otopinama (poglavlje 3.4.7.1.).

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu određen je kemijski sastav otpada nastalog konzumiranjem espresso kave „Kimbo“ u cilju valorizacije njegovih nutritivnih i fitokemijskih svojstava. Također, provedena je i kemijska analiza izvornog uzorka „Kimbo“ kave radi usporedbe dobivenih parametara.

Dakle, s obzirom na dobivene masene udjele ekstrahiranih analita utvrdio bi se potencijal i smisao daljnjeg iskorištavanja otpada pri izolaciji korisnih komponenti, poput masti, celuloze, lignina, polifenola kao i drugih značajnih sastojaka prikazanih u ovom radu.

Rezultati gravimetrijskog određivanja vlage, pepela, sulfatnog pepela, masti, celuloze i lignina, te ukupne kiselosti određene volumetrijskom, kiselinsko baznom titracijom i pH vrijednosti prikazani su u poglavljima 4.1. do 4.5.

UV/Vis spektrofotometrijom određen je maseni udio ukupnih fenola, flavonoida, šećera i proteina u ekstraktima uzoraka dobivenih refluksiranjem, a rezultati su prikazani i opisani u poglavljima 4.6. do 4.9.

4.1. Sadržaj vlage u uzorcima kave i otpada

Gravimetrijskom metodom određen je udio vode u uzorku espresso kave „Kimbo“ i otpada dobivenog njenim konzumiranjem.

Nakon provedenog uzastopnog sušenja, hlađenja i vaganja sadržaj vode za dva paralelna mjerenja u uzorku espresso kave iznosi 2,92 %, a za njen otpad 7,35 % vode.

Za usporedbu udio vlage u prženoj kavi kreće se u rasponu od 1,5 do 5 % (Farah, 2012), a u otpadu prikupljenom iz kafića i iskorištenih kapsula kave 6,35 % (Zuorro i Lavecchia, 2012), dok u zelenoj kavi 6,99 % (Nogaim i *sur.*, 2013).

S obzirom na navedeno može se zaključiti da udio vode ovisi o vrsti polazne sirovine, kao i načinu njene obrade, odnosno procesiranja.

4.2. Sadržaj pepela i sulfatnog pepela u uzorcima kave i otpada

Pepeo u namirnicama odnosi se na anorganski ostatak koji zaostaje nakon spaljivanja ili potpune oksidacije organskih tvari u hrani. U sastav pepela spadaju različiti

mineralni elementi, uključujući kalij, kalcij, magnezij, sumpor, fosfor, željezo, mangan, bor, bakar i drugi (Ballesteros i *sur.* 2014).

Spaljivanjem do konstantne mase pri temperaturi od 600 °C, 4 sata sadržaj pepela u uzorku espresso kave iznosi 4,36 %, a u otpadu nastalom nakon njene termičke obrade 1,15 %.

Nakon dodatka sumporne kiseline u prethodno žareni uzorak (poglavlje 3.4.3.) i njegovog spaljivanja pri 600 °C, 2 h maseni udio sulfatnog pepela za espresso kavu iznosi 6,08 %, a za otpad 1,94 %.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da espresso kava sadrži više pepela u odnosu na njen otpad. Potpunija slika njihovih mineralnih sastojaka mogla bi se utvrditi tek nakon provođenja analize atomskom apsorpcijskom spektrofotometrijom (AAS), što nije bio predmet ovog rada.

Različita istraživanja su pokazala da udio pepela može varirati, ovisno o vrsti kave i načinu obrade, pa tako prema Cruz i *sur.* (2012) pržena zrna kave sadrže oko 4,6 %, a zelena kava 4,16 % pepela.

4.3. Sadržaj masti u uzorcima kave i otpada

Sadržaj masti u uzorcima „Kimbo“ kave, koja čini smjesu 80 % Arabice i 20 % Robuste i njenog otpada je određen Soxhlet ekstrakcijom. Rezultati su pokazali da espresso kava sadrži nešto manje masti (14,24 %) u odnosu na otpad dobiven nakon njena konzumiranja (15,16 %).

Za usporedbu pržena kava (Cruz i *sur.* 2012) sadrži od 11 do 20 % lipida, s većim količinama u Arabici (14 - 20 %) u odnosu na Robusta vrstu (11 - 16 %), pa se može zaključiti da udio masti u espresso kavi i njenom otpadu dobivenih Soxlet ekstrakcijom s petroleterom nalazi unutar navedenih granica.

Dobivene vrijednosti potvrđuju da se većina lipida zadržava u otpadu kave, što ukazuje na mogućnost njegovog iskorištavanja kao vrijednog biosupstrata za ekstrakciju masti. Istraživanje Cruz i *sur.* (2012) je pokazalo da lipidi prisutni u Arabica i Robusta vrstama obuhvaćaju uglavnom triacilglicerole (75 %), sterole (5 %) i diterpene (19 %), te male frakcije tokoferola, pa procesiranjem kave zasigurno dolazi dijelom i do njihovog ekstrahiranja.

Prema istraživanju Mussatto i *sur.* (2011) otpad sadrži oko 15 % masti koja se postupcima transesterifikacije može prevesti u biodizel, a preostali kruti materijal služi za

proizvodnju etanola i peleta goriva. Također, dobivena mast se nakon odgovarajuće obrade može upotrebiti kao dodatak hrani, te u farmaceutskoj industriji.

4.4. Sadržaj celuloze i lignina u uzorcima kave i otpada

U odmašćenim uzorcima kave i njenog otpada određen je sadržaj celuloze. Dobivene vrijednosti su pokazale da oba uzorka sadrže niske količine celuloze: 0,33 % za espresso kavu i 0,12 % za njen otpad.

Maseni udio lignina je znatno veći, a izmjerene vrijednosti iznose 30,87 % za espresso kavu i 38,21 % za njen otpad.

Ballesteros i *sur.* (2014) u otpadu kave pronalaze vrijednosti celuloze od 12,40 %, a lignina 23,90 %, što potvrđuje da sadržaj analiziranih makromolekula može varirati ovisno o sirovini.

Budući da se radi o visokim udjelima lignina u otpadu kave, ovaj bioosupstrat bi se mogao iskoristiti kao jedan od potencijalnih izvora njegove izolacije, a potom i transformacije u biogorivo i gorive pelete.

4.5. Ukupna kiselost i pH u uzorcima kave i otpada

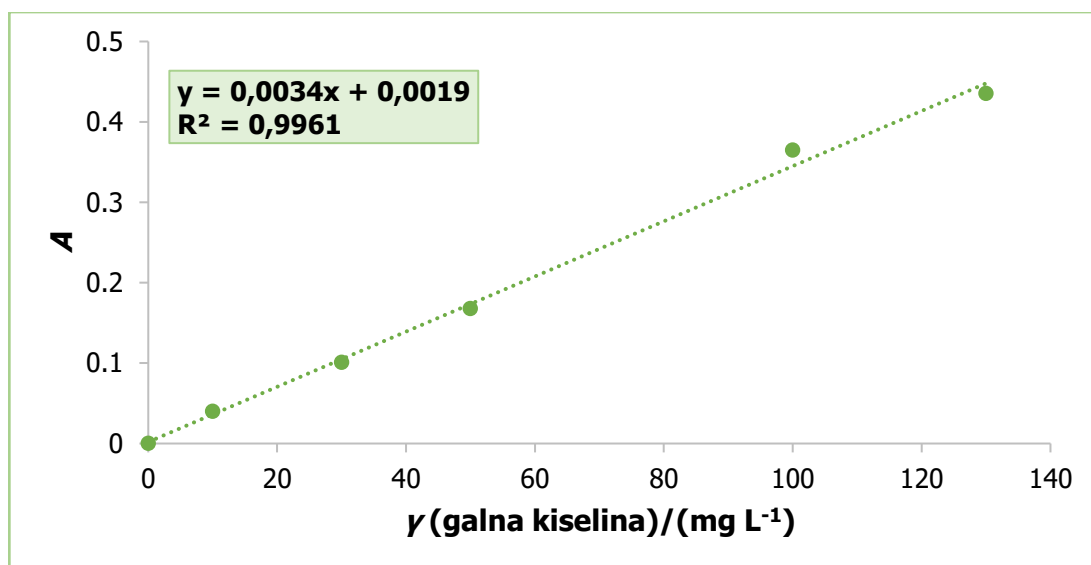
Dobiveni rezultati pH vrijednosti iznose 4,45 za espresso kavu i 5,18 za njen otpad. Ukupna kiselost kao mjera sadržaja kiseline u napitku (Cairns i *sur.*, 2002) iznosi 38,91 % za espresso kavu i 3,11 % za njen otpad, pa se može zaključiti da je polazna espresso kava kiselija od otpada dobivenog njenim konzumiranjem.

4.6. Sadržaj ukupnih fenola u uzorcima kave i otpada

U Tablici 1 se nalaze vrijednosti masenih koncentracija galne kiseline s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram (Slika 5). Iz dobivene jednadžbe pravca izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija te maseni udjeli ukupnih fenola u ekstrahiranim uzorcima (Tablica 2). Maseni udjeli izraženi su kao mg galne kiseline na g ekstrahirane kave, odnosno njena otpada.

Tablica 1. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina galne kiseline i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih UV/Vis spektrofotometrijom pri valnoj duljini od 760 nm.

Standardna otopina	γ (galna kiselina)/(mg L ⁻¹)	A	\bar{A}
0	0	0,0000	0,0000
		0,0000	
		0,0000	
1	10	0,0400	0,0402
		0,0400	
		0,0405	
2	30	0,1006	0,1010
		0,1011	
		0,1013	
3	50	0,1678	0,1679
		0,1679	
		0,1679	
4	100	0,3649	0,3649
		0,3649	
		0,3650	
5	130	0,4351	0,4353
		0,4353	
		0,4356	



Slika 5. Baždarni dijagram galne kiseline.

Tablica 2. Rezultati UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih fenola (UF) u uzorcima espresso kave „Kimbo“ i otpada dobivenog nakon njena konzumiranja.

Uzorak	<i>A</i>	$\bar{A} \pm SD$	$w(UF)/(mg\ g^{-1}) \pm SD$
Espresso kava 1	0,1237	0,1238 ± 0,00001	927,46 ± 18,21
	0,1238		
	0,1238		
Espresso kava 2	0,1271	0,1272 ± 0,0001	
	0,1273		
	0,1273		
Otpad 1	0,1512	0,1513 ± 0,0001	87,20 ± 3,99
	0,1513		
	0,1515		
Otpad 2	0,1420	0,1421 ± 0,0001	
	0,1421		
	0,1422		

Tablica 2 pokazuje da je udio ukupnih fenola znatno manji u otpadu kave s obzirom na ishodnu espresso kavu, što je bilo i za očekivati jer je uzorak bio podvrgnut termičkoj obradi u cilju dobivanja napitka, a time i degradaciji polifenola.

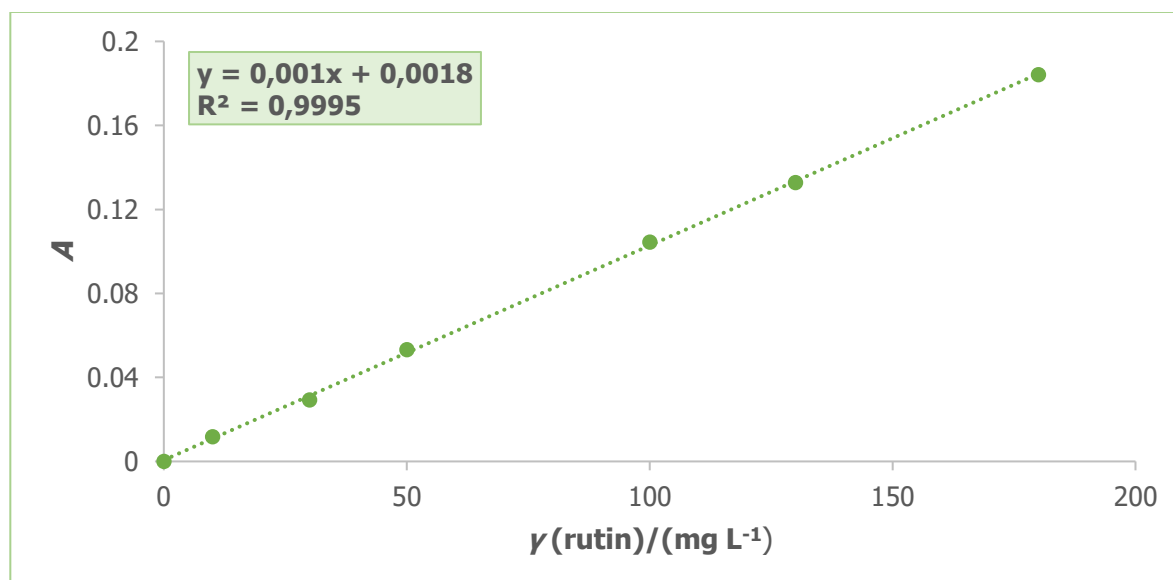
Dobiveni maseni udio ukupnih fenola u otpadu „Kimbo“ kave je oko 4 puta veći u odnosu na rezultate dobivene u istraživanja Panusa i *sur.* (2013), koji u otpadu kave sakupljenog iz kafića pronalaze vrijednosti od $19,16\ mg\ g^{-1}$.

4.7. Sadržaj ukupnih flavonoida u uzorcima kave i otpada

Vrijednosti masenih koncentracija rutina s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram prikazani su u Tablici 3 i na Slici 6. Maseni udjeli ukupnih flavonoida (Tablica 4) izraženi su kao mg rutina na g ekstrahirane espresso kave, odnosno otpada kave.

Tablica 3. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina rutina i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 510 nm.

Standardna otopina	$\gamma(\text{rutin})/(\text{mg L}^{-1})$	A	\bar{A}
0	0	0,0000	0,0000
		0,0000	
		0,0000	
1	10	0,0118	0,0117
		0,0118	
		0,0116	
2	30	0,0293	0,0293
		0,0293	
		0,0293	
3	50	0,0530	0,0531
		0,0531	
		0,0531	
4	100	0,1044	0,1044
		0,1045	
		0,1043	
5	130	0,1326	0,1327
		0,1327	
		0,1328	
6	180	0,1840	0,1841
		0,1841	
		0,1842	



Slika 6. Baždarni dijagram rutina.

Tablica 4. Rezultati UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih flavonoida (UFL) u uzorcima espresso kave „Kimbo“ i otpada dobivenog nakon njena konzumiranja.

Uzorak	<i>A</i>	$\bar{A} \pm SD$	$w(UFL)/(mg\ g^{-1}) \pm SD$
Espresso kava 1	0,0595	0,0596 ± 0,037	556,25 ± 64,81
	0,0596		
	0,0598		
Espresso kava 2	0,0509	0,0508 ± 0,005	
	0,0507		
	0,0507		
Otpad 1	0,0644	0,0643 ± 0,008	50,00 ± 2,94
	0,0644		
	0,0642		
Otpad 2	0,0591	0,0592 ± 0,003	
	0,0591		
	0,0594		

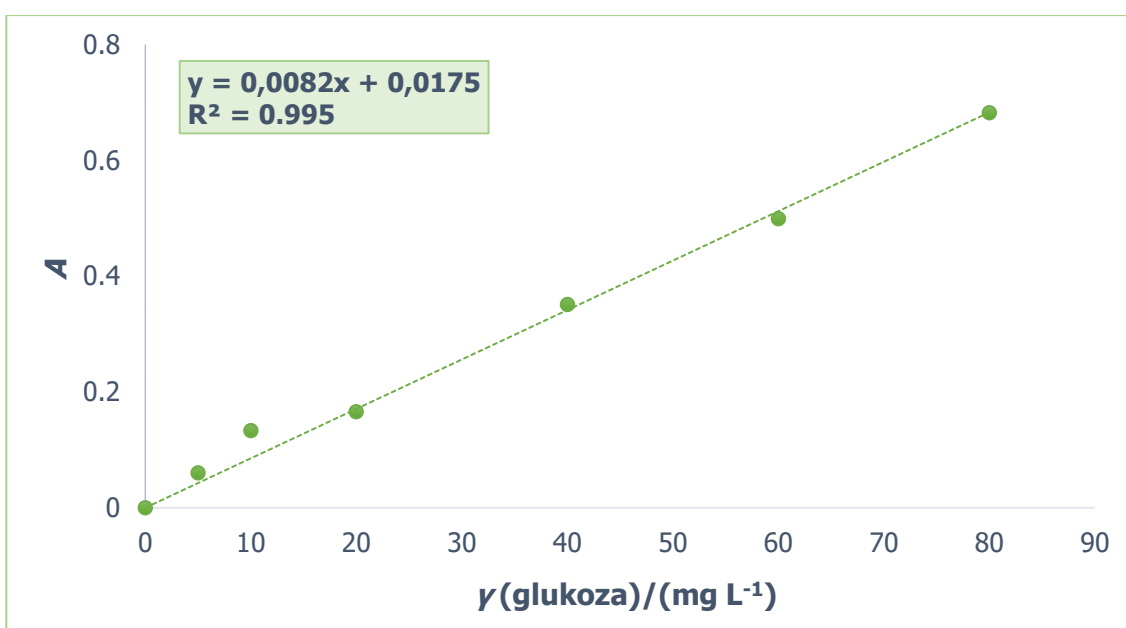
Iz dobivenih rezultata (Tablica 4) uočljivo je da espresso kava sadrži znatno veći udio ukupnih flavonoida u odnosu na otpad dobiven njenim konzumiranjem. Dobiveni maseni udio ukupnih flavonoida u otpadu kave je 15 puta veći u odnosu na vrijednosti dobivene u istraživanju Panusa i *sur.* (2013), koji u otpadu kave sakupljenom iz kafića pronalaze vrijednosti od $3,24\ mg\ g^{-1}$ ukupnih flavonoida.

4.8. Sadržaj ukupnih šećera u uzorcima kave i otpada

Vrijednosti masenih koncentracija glukoze s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram prikazani su u Tablici 5. Iz jednadžbe pravca (Slika 7) izračunate su vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija te maseni udjeli ukupnih šećera u uzorcima kave i otpada (Tablica 6). Maseni udjeli ukupnih šećera izraženi su kao mg glukoze na g ekstrahirane espresso kave, odnosno otpada kave.

Tablica 5. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina glukoze i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 492 nm.

Standardna otopina	$\gamma(\text{glukoza})/(\text{mg L}^{-1})$	A
0	0	0
1	5	0,06
2	10	0,133
3	20	0,166
4	40	0,351
5	60	0,499
6	80	0,682



Slika 7. Baždarni dijagram glukoze.

Tablica 6. Rezultati UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih šećera u ekstraktima espresso kave „Kimbo“ i otpada dobivenog nakon njena konzumiranja.

Uzorak	<i>A</i>	$\bar{A} \pm \text{SD}$	<i>w</i> (ukupni šećeri)/(mg g ⁻¹) ± SD
Espresso kava 1	0,379	0,379 ± 0,000	510,83 ± 5,03
	0,379		
Espresso kava 2	0,374	0,373 ± 0,001	
	0,372		
Otpad 1	0,169	0,170 ± 0,001	112,00 ± 0,58
	0,170		
Otpad 2	0,165	0,164± 0,001	
	0,163		

Tablica 6 pokazuje da je udio ukupnih šećera u uzorku espresso kave znatno veći (~ 5 puta) od udjela u njenom otpadu. Iako se radi o nižem prinosu šećera u otpadu kave ova biomasa bi se ipak mogla koristiti kao potencijalan izvor proizvodnje bioetanol (Choi i *sur.*, 2012).

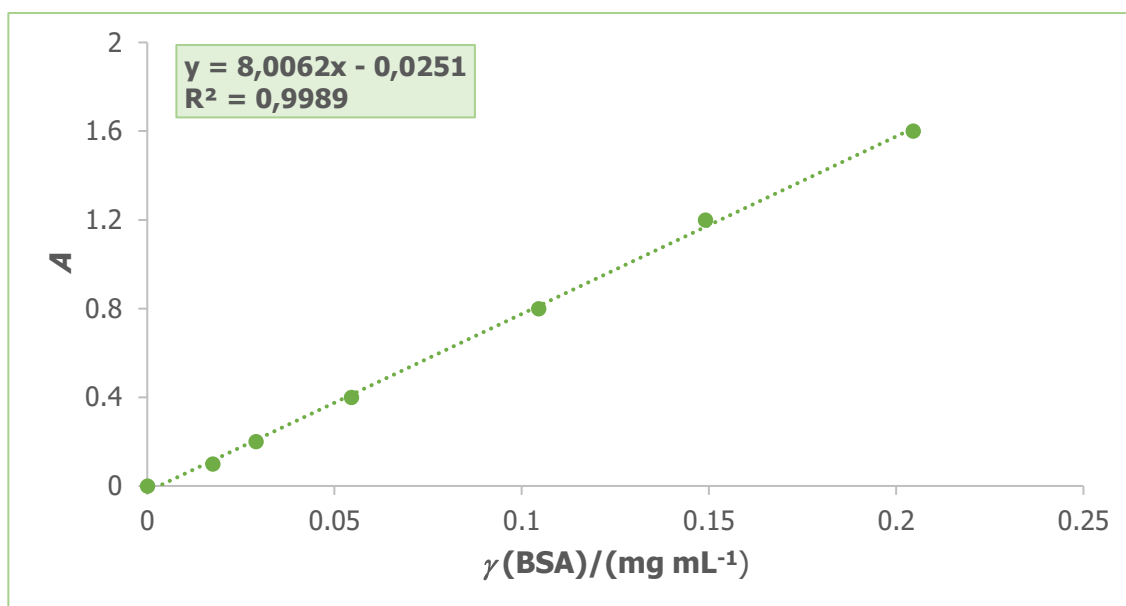
4.9. Određivanje ukupnih proteina

Vrijednosti masenih koncentracija BSA s pripadajućim izmjerenim vrijednostima apsorbancija na temelju kojih je izrađen baždarni dijagram prikazani su u Tablici 7.

Iz jednadžbe pravca (Slika 8) izračunaju se vrijednosti nepoznatih masenih koncentracija te maseni udjeli ukupnih proteina u ekstrahiranim uzorcima (Tablica 8). Maseni udjeli ukupnih proteina izraženi su kao mg BSA na g ekstrahirane espresso kave, odnosno otpada kave.

Tablica 7. Masene koncentracije individualnih standardnih otopina BSA i pripadajućih vrijednosti apsorbancija izmjerenih spektrofotometrom pri valnoj duljini od 540 nm.

Standardna otopina	$\gamma(\text{BSA})/(\text{mg mL}^{-1})$	A	\bar{A}
0	0	0	0
		0	
1	0,1	0,017	0,0175
		0,018	
2	0,2	0,029	0,029
		0,029	
3	0,4	0,054	0,0545
		0,055	
4	0,8	0,104	0,1045
		0,105	
5	1,2	0,148	0,149
		0,15	
6	1,6	0,203	0,2045
		0,206	



Slika 8. Baždarni dijagram BSA.

Tablica 8. Rezultati UV/Vis spektrofotometrijskog određivanja ukupnih proteina u ekstraktima espresso kave „Kimbo“ i otpada dobivenog nakon njena konzumiranja.

Uzorak	<i>A</i>	$\bar{A} \pm \text{SD}$	<i>w</i> (ukupni proteini)/(mg g ⁻¹) ± SD
Espresso kava 1	0,033	0,034 ±0,001	531,00 ± 68,84
	0,034		
Espresso kava 2	0,027	0,028 ± 0,001	
	0,029		
Otpad kave 1	0,058	0,060 ± 0,003	46,00 ± 2,65
	0,062		
Otpad kave 2	0,065	0,062 ± 0,004	
	0,059		

Iz Tablice 8 vidi se da espresso kava sadrži više proteina u odnosu na otpad espresso kave. Dobiveni udio proteina u izvornoj „Kimbo“ kavi je puno manji u odnosu na njen otpad, pa možemo pretpostaviti da je došlo do razgradnje proteina jer je uzorak bio podvrgnut visokoj temperaturi ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) radi dobivanja napitka kave.

U zaključku, ukupni rezultati provedenih analiza sumirani u Tablici 9 su pokazali da otpad kave „Kimbo“ sadrži visoke udjele masti, lignina i šećera što znači da se ova biomasa može iskoristiti pri njihovoj izolaciji, a time i implementaciji u prehrambeno-biotehnološkoj industriji.

Tablica 9. Kemijski sastav espresso kave „Kimbo” i otpada dobivenog nakon njena konzumiranja.

Parametri	w (kemijski sastav)/%	
	Espresso kava „Kimbo”	Otpad espresso kave „Kimbo”
Voda	2,92 ± 0,00	7,35 ± 0,00
Pepeo	4,36 ± 0,00	1,15 ± 0,00
Sulfatni pepeo	6,08 ± 0,00	1,94 ± 0,00
Masti	14,24 ± 0,00	15,16 ± 0,02
Celuloza	0,33 ± 0,01	0,12 ± 0,00
Lignin	30,87 ± 0,09	38,21 ± 0,88
Ukupni fenoli	92,75 ± 1,82	8,20 ± 0,40
Ukupni flavonoidi	55,63 ± 6,48	5,00 ± 0,29
Ukupni šećeri	51,09 ± 0,50	11,19 ± 0,06
Ukupni proteini	53,1 ± 6,88	4,60 ± 0,26

Valja istaknuti da istodobna prisutnost polisaharida, proteina i minerala čini otpad kave supstratom visoke biotehnološke vrijednosti, pa se kao takav može upotrijebiti u fermentacijskim procesima ili kao nosač za kultiviranje mikroorganizama (Mussatto i *sur.*, 2011).

Budući da otpad kave kao organski supstrat zahtijeva velike količine kisika za razgradnju, njegovo iskorištenje kao onečišćivača okoliša bilo bi zanimljivo ne samo s ekološkog, već i ekonomskog stajališta.

5. ZAKLJUČAK

Ovim radom je pokazano da otpad espresso kave nastao njenim konzumiranjem može poslužiti pri izolaciji različitih spojeva zanimljivih ne samo s ekološkog, već i ekonomskog stajališta.

Provedene kemijske analize su pokazale da izvorna espresso kava „Kimbo“ sadrži veći udio vode, pepela, sulfatnog pepela, celuloze, ukupnih fenola, flavonoida, šećera i proteina u odnosu na otpad nastao njenim konzumiranjem.

S druge pak strane otpad kave „Kimbo“ sadrži veći udio masti i lignima, što znači da bi se ovaj biosupstrat mogao koristiti u njihovim daljnjim izolacijama i transformacijama u prikladne proizvode.

6. POPIS LITERATURE

1. Anonymus, Slika ploda kave,
<<https://www.kaskus.co.id/thread/572054dedac13e351a8b456a/buah-kopi-green-bean-roasting-dan-ground-apa-sih-itu/>> Pristupljeno 17. svibnja 2018.
2. Agbor G. A., Vinson J. A., Donnelly P. E. (2014) Folin-Ciocalteu Reagent for Polyphenolic Assay. *International Journal of Food Science* **8**: 147 - 156.
3. Ashwell G. (1966) New colorimetric methods of sugar analysis. U: Methods in enzymology, Academic Press, str. 85 - 95.
4. Ballesteros L., Teixeira J., Mussatto S. (2014) Chemical, Functional, and Structural Properties of Spent Coffee Grounds and Coffee Silverskin. *Food and Bioprocess Technology* **7**: 3493 - 3503.
5. Bradley R. L. (2010) Moisture and total solids analysis. Food analysis, 4. izd., Springer str. 88.
6. Buffo R. A., Cardelli-Freire C. (2004) Coffee flavour: an overview. *Flavour Fragrance Journal* **19**: 99 – 104.
7. Cairns A. M., Watson M., Creanor S. L., Foye R. H. (2002) The pH and titratable acidity of a range of diluting drinks and their potential effect on dental erosion. *Journal of Dentistry* **30**: 313 - 317.
8. Choi I. S., Wi S. G., Kim S. B., Bae H. J. (2012) Conversion of coffee residue waste into bioethanol with using popping pretreatment. *Bioresource technology* **125**: 132 - 137.
9. Cruz R., Cardoso M. M., Fernandes L., Oliveira M., Mendes E., Baptista P., Morais S., Casal S. (2012) Espresso Coffee Residues: A Valuable Source of Unextracted Compounds. *Journal of agricultural and food chemistry* **60**: 7777 - 7784.
10. Esquivel P., Jiménez V. M. (2012) Functional properties of coffee and coffee by-products. *Food Research International* **46**: 488 - 495.
11. Farah A. (2012) Coffee constituents in Coffee: Emerging Health Effects and Disease Prevention, str. 1 - 38.
12. Kruezigier Keppy N., Allen M. W. (2009) The Biuret Method for the Determination of Total Protein Using an Evolution Array 8-Position Cell Changer, Thermo Fisher Scientific,
<https://www.analiticaweb.com.br/newsletter/16/51859_proteina_biureto.pdf>
Pristupljeno 14. svibnja 2018.
13. McClement J. (2003) Analysis of Ash and Minerals,

- <<http://people.umass.edu/~mcclemen/581Ash&Minerals.html>> Pristupljeno 16. svibnja 2018.
14. McClement J. (2003) Determination of Moisture and Total Solids, <<http://people.umass.edu/~mcclemen/581Moisture.html>> Pristupljeno 16. svibnja 2018.
 15. Miyawa J. H., Schulman S. G. (2001) Visible Spectrophotometry. U: *Handbook of Pharmaceutical Analysis*, Dekker str. 187 - 188.
 16. Mussatto S. I., Machado E. M., Martins S., Teixeira J. A. (2011) Production, Composition, and Application of Coffee and Its Industrial Residues. *Food and Bioprocess Technology* **4**: 661 - 672.
 17. Nogaim Q. A., Al-Duasis M., Al-Warafi A., Al-Erianee H., Al-Sayadi (2013) The Chemical Composition of Yemeni Green Coffee. *Journal of Food Chemistry and Nutrition* **01 (02)**: 42 - 48.
 18. Panusa A., Zuorro A., Lavecchia R., Marrosu G., Petrucci R. (2013) Recovery of Natural Antioxidants from Spent Coffee Grounds. *Journal of agricultural and food chemistry* **61**: 4162 - 4168.
 19. Pekal A., Pyrzynska K. (2014) Evaluation of Aluminium Complexation Reaction for Flavonoid Content Assay. *Food Analytical Methods* **7**: 1776 - 1782.
 20. Pomeranz Y., Meloan C. E. (1994) Ash and Minerals. U: *Food Analysis: theory and practice*, Springer str. 602.
 21. Skoog D. A., West D. M., Holler F. J. (1999) Osnove analitičke kemije, Školska knjiga, Zagreb.
 22. Zuorro A., Lavecchia R. (2012) Spent coffee grounds as a valuable source of phenolic compounds and bioenergy. *Journal of Cleaner Production* **34**: 49 - 56.

Izjava o izvornosti

Izjavljujem da je ovaj završni rad izvorni rezultat mog rada te da se u njegovoj izradi nisam koristio drugim izvorima, osim onih koji su u njemu navedeni.

Bojana Brnica
ime i prezime studenta